

В.П. Польовий, С.Ю. Каратєєва

ЗМІНИ ТКАНИННОГО ПРОТЕОЛІЗУ У ЩУРІВ РІЗНОГО ВІКУ ПІСЛЯ ТРАВМИ СЕЛЕЗІНКИ

Буковинський державний медичний університет, м. Чернівці

Резюме. В експериментах на білих щурах різного віку встановлено, що в статевозрілих тварин у відповідь на поранення селезінки відбувається помірне збільшення протеолітичного розпаду високо- і низькомолекулярних білків на тлі незначної активації колагенолізу на 30-у хв досліду. Реакція протеолітичних систем тканини селезінки на її поранення у старих щурів також характеризується підвищенням лізису низькомолекулярних білків впродовж всього одностодінного періоду спостереження. Однак протеолітичний розпад високомолекулярних білків збільшується лише на 45-у хв досліду і не відрізняється від контролю наприкінці експерименту. Основна різниця в реакції систем тканинного протеолізу при пораненні селезінки у статевозрілих і старих щурів полягає в надмірному і тривалому підвищенні у останніх колагенолітичної активності селезінкової тканини.

Ключові слова: селезінка, поранення, тканина, протеоліз, вік.

Вступ

Відомо, що накопичення в організмі протеолітичних ферментів, кінінів, вазоактивних пептидів, медіаторів запалення і середньомолекулярних пептидів порушує функцію органів системи ендогенної детоксикації, що нерідко призводить до поліорганної недостатності [1,5,7,8]. Протеолітичні ферменти викликають розпад сироваткових білків з утворенням проміжних продуктів білкового обміну. Продукти деградації амінокислот (октопамін, фенілетаноламін) є шкідливими нейромедіаторами, що блокують проведення нервового імпульсу, виявляють нейротоксичну дію, сприяють розвитку енцефалопатії. Внаслідок підвищеного катаболізму і втрат білка з ексудатом розвивається гіпопротеїнемія, що знижує колоїдно-осмотичний тиск з наступним переміщенням води з капілярного русла в міжклітинний простір та порушенням трофіки клітин і тканин [9]. З активацією протеолізу пов'язано утворення молекул середньої маси (від 500 до 5000D), які

вважаються найважливішим індуктором ендотоксикозу [6]. Молекули середньої маси порушують функціональний стан мітохондрій, руйнують гепатоцити, дезінтегрують функції лімфоцитів, погіршують кровоутворення, синтез гемоглобіну та активність цілого ряду ферментів [4]. Особливого значення протеолітичні системи, що локалізовані на рівні тканин, набувають у разі абдомінальної травми, коли тяжкий стан хворого обумовлений не тільки кровотечею, але й розвитком синдрому системної запальної реакції. Разом з тим, вікові аспекти динаміки змін тканинного протеолізу при пораненні внутрішніх органів залишаються нез'ясованими.

Мета роботи

Визначити особливості змін тканинного протеолізу у старих щурів з пораненням селезінки.

Матеріали і методи

У роботі використано 63 статевозрілих і 59 старих самців білих щурів з масою тіла 0,14-0,16 кг (статевозрілі тварини віком 4-6 міс.) та 0,49-0,55 кг (старі тварини віком 20-22 міс.).

Усі операційні втручання проводились відповідно до основних вимог Ванкуверських конференцій (1979, 1994) про біомедичні експерименти щодо гуманного відношення до лабораторних тварин, в асептичних умовах, під уретановим наркозом (1000 мг на 1 кг маси тіла). Після серединної лапаротомії вздовж білої лінії живота спричинювали травмування селезінки у статевозрілих і старих щурів за допомогою очного хірургічного пінцету, робочі кінці якого заводили на краї селезінки на 2 мм і стискували її тканину. У всіх випадках після поранення селезінки на розріз черевної порожнини накладали 5 швів, що запобігало тепловим втратам. Дослідження змін параметрів тканинного протеолізу виконувалось серійно (по 15 тварин у серії) – через 15, 30, 45 і 60 хв після поранення селезінки.

Після евтаназії тварин шляхом забору крові з черевної аорти наважки селезінки одразу заморожували в рідкому азоті. Перед дослідженням тканинного протеолізу наважки селезінки розморожували, гомогенізували в 2,0 мл

охолодженого боратного буферу (рН 9.0) і надалі використовували в біохімічному аналізі.

Дослідження протеолітичної активності селезінкової тканини проводили за лізисом азоальбуміну, азоказеїну та азоколу ("Simko Ltd.", Україна) [2]. *Принцип методу* полягає в тому, що при інкубації білкових азосполук в присутності активаторів та інгібіторів протеолізу, які містяться у селезінковій тканині, відбувається лізис азоальбуміну (деградація низькомолекулярних протеїнів), азоказеїну (протеоліз високомолекулярних білків) та азоколу (колагеноліз), інтенсивність якого оцінюється за ступенем забарвлення інкубаційного розчину в лужному середовищі.

По 0,1 мл гомогенату селезінкової тканини вносили у пробірки, які містять 5мг азосполуки та 1,9 мл боратного буферу (рН 9.0). У дублікати пробірок "РП" (розчин порівняння) замість гомогенату селезінки додавали 0,1 мл боратного буферу. Усі пробірки одночасно інкубували у водяному термостаті "ТПС-1" при температурі 37°C протягом 15 хв. За цей проміжок часу відбувається розпад азосполук і вивільнення барвника в інкубаційний розчин відповідно протеолітичній активності селезінкової тканини. Після інкубації усі пробірки одночасно охолоджували до 5°C для зупинки лізису азосполук. У кожену пробірку для залужування середовища додавали по 20 мкл 5 М розчину NaOH. До усіх пробірок додавали 2,0 мл дестилірованої води, вміст фільтрували через шар вати, що знаходиться у шприцах. На спектрофотометрі "СФ-46" (Росія) у кюветах 1 см при довжині хвилі 440 нм проти розчину порівняння проводили замір оптичної густини проб. Отримані екстинції перераховували в мкг азосполуки на 1 г селезінкової тканини за 1 год інкубації за формулою: лізис азосполуки = $(E_{440} \times 1000 \times 4 \times k) : n$ = мкг азосполуки/1 г селезінкової тканини за 1 год, де k – коефіцієнт перерахунку, n – наважка селезінкової тканини (мг).

Статистичну обробку отриманих даних проводили методом варіаційного аналізу на РС IBM 586 з визначенням критерію Стюдента за допомогою програми "BioStat" [3].

Обговорення результатів дослідження

Результати дослідження динаміки змін протеолітичної активності у тканині селезінки після її поранення у статевозрілих і старих щурів наведені у таблиці. У статевозрілих щурів через 15 хв після поранення селезінки інтенсивність протеолітичного розпаду низькомолекулярних білків у селезінковій тканині на 21,8%. Через 30 хв лізис азоальбуміну перевищував вихідний рівень на 37,3%, не відрізнявся від останнього через 45 хв і знову збільшувався на 23,2% на 60-у хв спостереження. У старих щурів у відповідь на поранення селезінки інтенсивність лізису в її тканині низькомолекулярних білків збільшувалась починаючи з 30 хв – на 51,2% і надалі залишалася вищою за контроль: на 45-у хв – на 82,8%, на 60-у хв – на 63,6%. Порівняльний аналіз не виявив достовірної різниці між вихідною інтенсивністю лізису азоальбуміну в тканині селезінки статевозрілих і старих щурів. Через 15 хв після поранення селезінки інтенсивність протеолітичного розпаду низькомолекулярних білків у старих тварин була на 17,6% меншою, на 45-у хв експерименту, навпаки, на 32,1% більшою, ніж у статевозрілих щурів. Водночас на 30-у і 60-у хв досліді достовірних міжгрупових різниць не виявлялось.

У статевозрілих щурів після поранення селезінки тканинний лізис високомолекулярних білків достовірно збільшувався тільки на 30-у і 60-у хв експерименту, коли лізис азоказеїну перевищував вихідний рівень відповідно на 33,4 і 34,8%. У старих тварин після поранення селезінки інтенсивність протеолітичного розпаду високомолекулярних білків у її тканині зростала лише на 45 хв досліді – лізис азоказеїну в даний період перевищував контроль на 42,0%. Визначальна казеїнолітична активність селезінкової тканини у статевозрілих і старих щурів була практично однаковою. Достовірна між групова різниця виявлялась через 30 і 60 хв після поранення селезінки, коли у старих тварин лізис азоказеїну був меншим, ніж у статевозрілих щурів, відповідно на 31,8 і 19,6%.

У відповідь на поранення селезінки у статевозрілих щурів колагенолітична активність селезінкової тканини підвищувалась на 25,8% тільки на 30-у хв досліді, а в інші періоди спостереження практично відповідала вихідному рівню. Водночас реакція тканинного колагенолізу на поранення селезінки у старих тварин

характеризувалась підвищенням лізису азоколу, який перевищував контроль на 30-у хв експерименту на 61,5%, на 45-у хв – у 2,1 раз, на 60-у хв досліді – на 76,5%. Порівняльний аналіз показав, що вихідний рівень колагенолітичної активності у старих тварин був на 23,2% меншим, ніж у статевозрілих щурів. Водночас, починаючи з 45-ї хв спостереження, інтенсивність колагенолізу в тканині селезінки у старих щурів перевищувала таку у статевозрілих тварин на 35,8%, а наприкінці експерименту виявилась більшою на 54,3%.

Відомо, що процеси репаративної регенерації супроводжуються проліферацією фібробластів з утворенням колагену, який заміщує зону ураженої тканини. Водночас відбувається руйнування колагену, що за рахунок динамічної рівноваги запобігає надмірному колагеногенезу. Серед матричних металопротеїназ, що руйнують екстрацелюлярний матрикс, металопротеїназа 2 (MMP-2) утворюється як неактивний зімоген (proMMP-2), від якого відщеплюється NH_2 -термінальний сегмент, ідентичний так званій 72-kDa колагеназі/желатиназі типу IV. За дії активаторів утворюється активна форму MMP-2 з молекулярною масою 67 000. Такі ендопептидази як трипсин, хемотрипсин, плазмін, плазмовий калікреїн, тромбін, еластаза нейтрофілів, катепсин G, матрична металопротеїназа 3 і термолізін здатні активувати proMMP-1 (проколагеназа) і proMMP-3 (простромелізін). MMP-2 викликає деградацію фібронектину, ламініну і колагену типу V та, в меншій мірі, колагену типу IV, протеоглікани і еластин [10].

За результатами нашого дослідження, у старих щурів з травмою селезінки відбувається надмірна активація колагенолізу, що здатне суттєво затримати процеси загоєння ураженої ділянки селезінки.

Таблиця

Динаміка змін тканинного протеолізу в щурів із пораненням селезінки ($\bar{x} \pm Sx$)

Періоди спостереження	Статевозрілі щури n=15			Старі щури n=15		
	Лізис азоальбуміну, мкг/1 г тканини за 1 год	Лізис азоказеїну, мкг/1 г тканини за 1 год	Лізис азоколу, мкг/1 г тканини за 1 год	Лізис азоальбуміну, мкг/1 г тканини за 1 год	Лізис азоказеїну, мкг/1 г тканини за 1 год	Лізис азоколу, мкг/1 г тканини за 1 год
Контроль (вихідні показники)	18,59 \pm 1,02	11,66 \pm 0,86	8,22 \pm 0,59	15,65 \pm 1,60 $p_1 > 0,05$	9,58 \pm 1,18 $p_1 > 0,05$	6,31 \pm 0,66 $p_1 < 0,05$
Через 15 хв після поранення	22,64 \pm 1,32 $p < 0,05$	13,48 \pm 0,93 $p > 0,05$	9,31 \pm 0,67 $p > 0,05$	18,66 \pm 1,21 $p > 0,05$ $p_1 < 0,05$	11,57 \pm 0,87 $p > 0,05$ $p_1 > 0,05$	8,23 \pm 0,73 $p > 0,05$ $p_1 > 0,05$
Через 30 хв після поранення	25,53 \pm 1,69 $p < 0,02$	15,55 \pm 1,11 $p < 0,02$	10,34 \pm 0,80 $p < 0,05$	23,67 \pm 1,63 $p < 0,05$ $p_1 > 0,05$	10,61 \pm 0,83 $p > 0,4$ $p_1 < 0,02$	10,19 \pm 0,68 $p < 0,001$ $p_1 > 0,5$
Через 45 хв після поранення	21,65 \pm 1,51 $p > 0,05$	14,38 \pm 1,50 $p > 0,05$	9,71 \pm 0,72 $p > 0,05$	28,61 \pm 1,69 $p < 0,001$ $p_1 < 0,02$	13,60 \pm 1,02 $p < 0,05$ $p_1 > 0,5$	13,19 \pm 0,88 $p < 0,001$ $p_1 < 0,02$
Через 60 хв після поранення	22,90 \pm 1,56 $p < 0,05$	15,72 \pm 1,11 $p < 0,02$	7,22 \pm 0,60 $p > 0,05$	25,61 \pm 1,45 $p < 0,001$ $p_1 > 0,05$	12,64 \pm 1,00 $p > 0,05$ $p_1 = 0,05$	11,14 \pm 0,68 $p < 0,001$ $p_1 < 0,001$

Примітки.

p – ступінь достовірності різниць показників відносно вихідного рівня;

p₁ - ступінь достовірності різниць показників у статевозрілих і старих щурів у відповідні періоди спостереження;

n – число спостережень.

Висновки

1. У статевозрілих тварин у відповідь на поранення селезінки відбувається помірне збільшення протеолітичного розпаду високо- і низькомолекулярних білків на тлі незначної активації колагенолізу на 30-у хв досліджу.

2. Реакція протеолітичних систем тканини селезінки на її поранення у старих щурів характеризується підвищенням лізису низькомолекулярних білків впродовж всього одногодинного періоду спостереження. Однак протеолітичний розпад високомолекулярних білків збільшується лише на 45-у хв досліджу і не відрізняється від контролю наприкінці експерименту.

3. Різниця в реакції систем тканинного протеолізу при пораненні селезінки у статевозрілих і старих щурів полягає в надмірному і тривалому підвищенні у останніх колагенолітичної активності селезінкової тканини.

Перспективи подальших досліджень

Визначення показників тканинного протеолізу в клініці може бути індикатором тяжкості перебігу ушкодження селезінки.

Література.

1. Бардахчян Э.А. Роль клеточных и гуморальных медиаторных систем в патогенезе шокового легкого, вызванного эндотоксином / Э.А. Бардахчян, Н.Г. Харламова // Анестезиол. и реаниматол. - 1999.- №5. - С.51-54.
2. Веремеенко К.Н., Голобородько О.П., Кизим А.А. Протеолиз в норме и при патологии / К.Н. Веремеенко, О.П. Голобородько, А.А. Кизим - К.: Здоров'я, 1988. - 200 с.
3. Гланц С.И. Медико-биологическая статистика / С.И. Гланц – М.: Практика, 1999. – 459 с.
4. Дорохин К.М. Патофизиологические аспекты синдрома эндогенной интоксикации / К.М. Дорохин, В.В. Спас // Анестезиол. и реаниматол. - 2004. - №1. - С.56-60.
5. Іфтодій А.Г. Вплив електричного поля постійного струму на тканинний та плазмовий протеоліз при гострому панкреатиті / А.Г. Іфтодій // Клін. хірургія.-1998.-№ 2.-С.34-36.
6. Криворучко И.А. Механизмы возникновения полиорганной недостаточности при перитоните / И.А. Криворучко, И.В. Гусак, А.М. Тищенко [и др.] // Клін. хірургія. - 2001. - №2-3. - С.32.
7. Руденко В.Г. Протеазы, ингибиторы протеаз и

противоревматическая терапия / В.Г. Руденко, Ю.В. Руденко. // Ревматология. - 1999. - № 3. - С.32-38.

8. Руденко В.Г., Руденко Ю.В. Протеолитические ферменты и их ингибиторы при артритах / В.Г. Руденко, Ю.В. Руденко. // Ревматология. - 1999. - № 4. - С.42-49.

9. Desser L. Proteolytic enzymes and amylase induce cytokine production in human peripheral blood mononuclear cells in vitro / L. Desser, A. Rehberger, E. Kokron, W. Paukovits // Cancer Biotherapy. - 2002. - V.9, № 3. - P.253-263.

10. Okada Y. Matrix metalloproteinase 2 from human rheumatoid synovial fibroblasts. Purification and activation of the precursor and enzymic properties / Y. Okada, T. Morodomi, J.J. Enghild [et al.] // Eur. J. Biochem. - 1999. - Vol. 194, № 3. - P.721-730.

ИЗМЕНЕНИЯ ТКАНЕВОГО ПРОТЕОЛИЗА У КРЫС РАЗНОГО ВОЗРАСТА ПОСЛЕ ТРАВМИРОВАНИЯ СЕЛЕЗЕНКИ

В.П. Полевой, С.Ю. Каратеева

Резюме. В экспериментах на белых крысах разного возраста установлено, что у половозрелых животных в ответ на ранение селезенки происходит умеренное увеличение протеолитического распада высоко- и низкомолекулярных белков на фоне незначительной активации коллагенолиза на 30-ю мин опыта. Реакция протеолитических систем ткани селезенки на ее ранение у старых крыс также характеризуется повышением лизиса низкомолекулярных белков на протяжении всего одночасового периода наблюдения. Однако протеолитический распад высокомолекулярных белков увеличивается только на 45-ю мин опыта и не отличается от контроля в конце эксперимента. Основное отличие в реакции систем тканевого протеолиза при ранении селезенки у половозрелых и старых крыс заключается в чрезмерном и продолжительном повышении у последних коллагенолитической активности селезеночной ткани.

Ключевые слова: селезенка, ранение, ткань, протеолиз, возраст.

CHANGES OF TISSUE PROTEOLYSIS IN RATS OF DIVERSE AGE FOLLOWING SPLENIC INJURY

V.P. Poliovyi, S.Yu. Karatieieva

Abstract. It has been established in experiments on albino rats of diverse age that occurs a moderate increase of a proteolytic breakdown of high and low-molecular proteins against a background of an insignificant activation of collagenolysis in sexually mature animals in response to a splenic injury by the 30-th minute of the experiment. The response of the proteolytic systems of the splenic tissues to its injury in old rats is also characterized by elevated lysis of low-molecular, proteins throughout the entire one-hour period of observation. However, the proteolytic breakdown of high-molecular proteins enhances only by the 45-th minute of the end of the experiment. The principal difference in the reaction of the systems of tissue proteolysis in case of a splenic injury in sexually mature and old rats consists in an excessive and prolonged elevation in the latter of the collagenolytic activity of the splenic tissue.

Key words: spleen, injury, tissue, proteolysis, age.

Bukovinian State Medical University (Chernivtsi)

Clin. and experim. pathol. - 2008. - Vol.7, №3.-P..

Надійшла до редакції 29.07.2008

Рецензент – проф. Ю.Є. Роговий